Food Eng. Prog.
Vol. 18, No. 1. pp. 25~31 (2014.02)
DOI http://dx.doi.org/10.13050/foodengprog.2014.18.1.25

산업식품공학
Food Engineering Progress

복분자박을 이용한 안토시아닌 최적정제공정 연구

김희선 · 강은진 · 김원석[1] · 김명환*
단국대학교 식품공학과, [1]서도비엔아이(주)

Study to find the Optimal Purification Processing Conditions of Anthocyanin from *Bokbunja* Byproducts

Hee-Sun Kim, Eun-Jin Kang, Won-Suk Kim[1], and Myung-Hwan Kim*
Department of Food engineering, Dankook University
[1]SDBNI Co., LTD

Abstract

This study was performed to determine the purification yield, color value, and total anthocyanin content of purified anthocyanins from *Bokbunja* byproducts for analyzing the optimal conditions of purification processing by response surface methodology (RSM) based on HCl or trifluoroacetic acid (TFA) concentration as an acidulent and ethanol concentration as an eluent. From the results of purification yield, color value, and total anthocyanin content of the purified anthocyanins, it was shown that HCl was better than TFA for purification processing from *Bokbunja* byproducts and the optimal concentration range of ethanol was 60-75%. The optimal purification conditions for HCl or TFA, ethanol concentration, and overall desirability by analysis of multiple response surface methodology with the same weighed value for each dependent variable were 0.84%, 73.12% and 0.77 for HCl acidulent and 1.00%, 60.75%, and 0.96 for TFA acidulent, respectively.

Key words: *Bokbunja* byproducts, purification, HCl, trifluoroacetic acid, ethanol, anthocyanin

서 론

복분자(*Rubus coreanus* Miq.)는 장미목(Rosales) 장미과(Rosaceae)의 낙엽관목으로 한반도 남부지방, 중국, 일본 등지에 분포하고 있으며 열매는 7-8 월에 성숙되어 붉은색으로 익으며 점차 검 붉은색으로 된다(Choung & Lim, 2012). 복분자에 함유되어 있는 안토시아닌(anthocyanin)은 합성착색제를 대체할 수 있는 천연색소로서 주목을 받고 있으며 색소 기능성 이외의 강한 항산화작용이 혈관계 질환, 암, 당뇨, 신경계 질환 등의 치료에 효과가 있다는 연구결과가 있다(Konczak & Zhang, 2004). 안토시아닌은 수용성 flavonoid 색소로서 각종 식물체의 꽃, 과실 등에 존재하며 적색에서 청색에 이르는 다양한 색을 발현하는 색소이다(Choung, 2004). 안토시아닌 천연색소원으로 복분자 이외로 주목 받고 있는 것들은 자색고구마, 꽃양배추, 포도껍질, 오디, 유색미, 꽃 베고니아 등이다(Jeong & Seo, 2009). 식물체에서 600 여 종 이상이 발견되고 있는 안토시아닌은 모두 안토시아니딘(anthocyanidin) 배당체로서 안토시아니딘은 flavyilium(2-phenyl-1-benzopyrilim)의 기본구조에 수산기 또는 메톡실기가 치환되어있는 구조를 가진다(Choi, 2010; He & Giusti, 2011). 복분자는 씨앗과 과피가 전체 과실의 20-25%를 차지하며 착즙 후 가공 과정을 거쳐서 술, 음료, 전병, 환 등으로 제품화되고 있다. 복분자의 착즙 공정에서 발생되는 복분자 박의 일부는 사료로 이용되고 있으나 대부분 폐기되고 있는 실정이다(Choung & Lim, 2012).

안토시아닌 추출방법으로 주로 용매추출법을 이용하는데 메탄올 추출은 에탄올, 아세톤, 열수 추출에 비하여 각각 20, 50, 73%의 수율 증가 효과가 있으나 식품에서는 메탄올의 독성 때문에 일반적으로 에탄올 추출법을 이용한다(Metivier et al., 1980). 그 이외의 추출방법으로써 초임계 추출, 초음파추출, 유산균발효 추출, 마이크로웨이브추출 등이 연구 보고되었다(Ryu & Kwon, 2013). 안토시아닌 추출과정에서 당류, 유기산, 단백질 등이 동시에 추출됨으로서 정제(purification) 과정이 요구되어진다. 정교한 정제 방법으로는 countercurrent chromatography(CCC), medium pressure liquid chromatography(MPLC), high performance

*Corresponding author: Myung-Hwan Kim, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea
Tel: +82-41-550-3563; Fax: +82-41-559-7868
E-mail: kmh1@dankook.ac.kr
Received November 28, 2013; revised January 14, 2014; accepted January 15, 2014

chromatography(HPLC) 등이 있으나(Castaneda-Ovando et al., 2009) 일반적으로 경제성을 지닌 대규모 정제방법으로 이온교환수지(ion exchange resin)법을 사용하며 안토시아닌 조추출물을 이온에 통과시킨 다음 에탄올이나 메탄올을 이용하여 용출시킨다.

본 연구에서는 복분자박의 안토시아닌을 천연색소원으로 활용하기 위하여 정제방법으로써 MCX SPE cartridge를 흡착제(sorbent)로 사용하였으며 pH 조절제로서 HCl 또는 trifluoroacetic acid(TFA)의 농도 변화 및 용출제로서 ethanol 농도 변화에 따른 수율, 색 가 및 총 안토시아닌 함량 등을 분석하였다. 실험 설계는 요인실험법(full factorial design)에 의하여 행하였으며 다중반응표면분석법에 의하여 최적의 안토시아닌 정제 조건을 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 복분자 부산물은 코레아누스(Gochang-gun, Jeollabuk-do, Korea)에서 제공받은 것으로 착즙 후 압착한 시료였으며 분석에 사용한 시약은 모두 Sigma사(St. Louis, USA)의 특급 시약을 사용하였다.

추출 및 정제 공정

복분자 부산물의 추출 공정은 건물 1 g을 60% 에탄올 200 mL와 함께 sonicator(VC 601, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT., USA)를 이용하여 40ºC에서 1시간 추출한 후 수율 향상을 위하여 pectinase로 효소 처리를 하였다. 효소 선정 및 처리 공정은 예비실험을 통하여 최적 조건을 찾았으며 pectinase(Pectinex Ultra SP-L)농도 1.5 mL/100 L, 효소 처리 온도 40ºC, 효소 처리 시간 2시간으로 행한 다음 4000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 상등액의 지방 성분을 제거하기 위해 ethyl ether:*n*-hexane(1:6, v/v)용액으로 세척한 다음 진공회전농축기(BUCHI rotavapor R-124 and BUCHI water bath B-480, Flawil, Switzerland)로 40ºC에서 20 Brix로 농축한 후 deep freezer에 보관하여 사용하였다. 복분자 추출물의 정제공정은 MCX SPE cartridge (6 mL, Waters Corp., Milford, USA)를 sorbent로 행하였고 pH 조절제로 HCl 또는 trifluoroacetic acid(TFA)를 사용하였으며 용출제로는 ethanol을 사용하였다.

실험설계

복분자 추출물을 이용한 안토시아닌계 정제공정의 최적화를 위한 실험 설계는 요인실험법(full factorial design)을 이용하였으며 MCX SPE cartridge를 sorbent로 행하였고 이때 요인은 두 가지로서 HCl 또는 TFA의 농도(X_1)와 ethanol의 농도(X_2)를 사용하였으며 각 요인에 대한 수준은 Table 1과 같다. 각 독립변수는 수준을 3 가지로하여 -1~1 범위의 각 code value를 갖도록 선형화하였다. 또한 처리 조건에 따른 최적화 공정설계는 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 주요 반응 변수(측정값)의 최적 조건을 다중반응표면분석법에 의하여 찾았다.

Table 1. Factors and levels of experiment for anthocyanin purification from *Bokbunja* byproducts.

Factors		Code value		
		-1	0	1
Concentration of HCl or TFA (%)	X_1	0.10	0.55	1.00
Concentration of ethanol (%)	X_2	60	75	90

각 인자의 수준 변화에 따른 안토시아닌계 정제공정의 최적화를 위하여 분산분석, 이차다항회귀곡선식 및 반응표면분석법 등의 통계 방법을 이용하였으며 통계분석은 SAS 9.3을 이용하였다(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

수율

정제수율은 아래의 공식에 의하여 산출하였다.

$$Yield\ of\ purification\ (\%) = \frac{C}{(A+B)} \times 100$$

여기서, A: 칼럼에 통과시킨 시료량, B: 안토시아닌 용출 시 사용한 용매량, C: 정제물

색 가

시료의 흡광도가 0.3~0.7의 범위가 되도록 pH 3.0의 구연산 인산이나트륨 완충액을 가하여 100 mL로 한 것을 시험 용액으로 하였으며 원심 분리하여 그 상등 액을 사용하였다. pH 3.0의 구연산 인산이나트륨 완충액을 대조 액으로 하여 액 층 1 cm, 파장 500~540 nm 부근의 극대 흡수 파장에서 시험 용액의 흡광도 A를 측정하여 다음 식에 따라 색가(color value)를 구하였다.

$$Color\ value\ (E10\%,\ 1\ cm) = \frac{A \times 10}{Sample\ weight\ (g)}$$

총 안토시아닌 함량

총 안토시아닌 정량은 Hosseinian et al.(2008)의 pH differential method에 따라 측정하였다. 각 추출물 0.5 mL에 0.025 M potassium chloride buffer(pH 1.0)와 0.4 M sodium acetate buffer(pH 4.5)를 가하여 최종 부피를 5 mL로 한 다음 510 및 700 nm에서 반응 액의 흡광도를 각각 측정하여 아래의 식으로 결과를 얻었다.

$$Total\ anthocyanin\ content\ (mg/kg) = \frac{A \times MW \times D \times 1000}{\varepsilon \times V}$$

여기서, A(absorbance value) = $(A_{510nm}\text{-}A_{700nm})_{pH1.0}\text{-}(A_{510nm}\text{-}A_{700nm})_{pH4.5}$, MW(molecular weight of cyanidin-3-glucoside)

= 449.2, D(dilution factor) = dilution ratio of sample, ε(cyanidin-3-glucoside molar absorbance) = 26,900 $M^{-1}cm^{-1}$, V = final volume of sample

결과 및 고찰

외형

안토시아닌 정제공정에서 MCX SPE cartridge를 sorbent로 사용하였고 두 가지 요인으로 pH 조절제로서 HCl 또는 TFA의 농도(0.1-1.0%)와 용출제로서 ethanol의 농도(60-90%)에 따른 정제된 안토시아닌의 외형 사진은 Fig. 1과 같다. MCX sorbent는 강력한 양이온 교환과 역상 흡착 작용(reversed phase adsorption)의 특성을 지니고 있으며 chokeberry로부터의 안토시아닌 정제공정에서 optimized

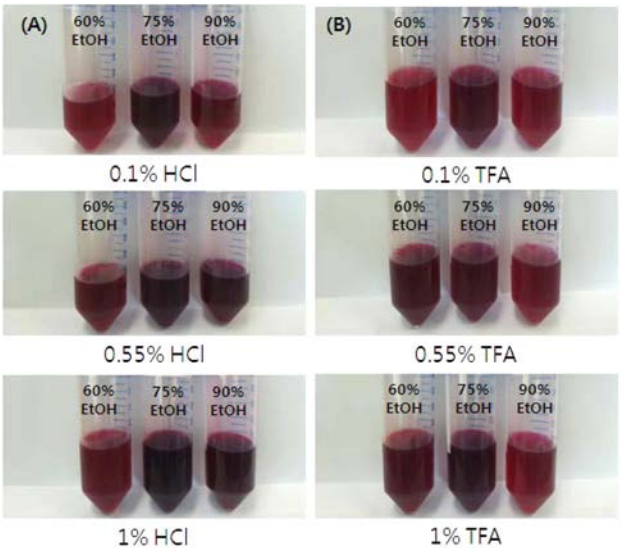

Fig. 1. Appearances of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts depending on HCl (A) or TFA (B), and ethanol concentrations.

C18, original C18, LH20 및 HLB 등의 sorbent들 보다 높은 안토시아닌 순도 및 회수율을 얻었다는 연구결과가 있다(He & Giusti, 2011). 정제공정에서의 안토시아닌 안정성을 위하여 pH 조절제로서 HCl 또는 TFA를 사용하였다. 안토시아닌은 pH에 따라서 색상이 변화되는데 pH 1에서는 붉은 색상을 나타내고, pH 2-4에서는 푸른 색상을 보이고, pH 5-6에서는 무색화가 이루어지며, pH가 7 이상에서는 aldehyde와 phenolic acid로 분해된다(Fleschhut et al., 2006). pH가 낮을수록 붉은색을 띄게 되는 것은 red flavyilium ion에 기인된다고 하였다(Cooper-Diver, 2001). 용출에 사용되는 것으로는 에탄올, 메탄올, 증류수 등이 이용되고 있으며 독성과 수율을 고려하여 식품산업에서는 주로 에탄올이 사용된다. 분리된 안토시아닌의 색상 측면에서 관능적으로 HCl이 TFA보다 붉은색이 강하였으며 HCl의 농도가 1%, 용출에 이용되는 에탄올은 0.75% 조건에서 붉은색이 가장 진하게 나타났다.

수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량

두 가지 요인으로서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 안토시아닌의 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량을 조사한 결과 Table 2와 같다. 안토시아닌의 수율 측정은 추출물과 용매 량의 무게에서 MCX SPE cartridge에 통과된 추출물을 농축하여 얻은 정제물의 무게 비율로 나타내었으며, 색가 측정은 일반적으로 3-O-glucosylated 안토시아닌의 최대 흡수 파장대인 510-530 nm를(He & Giusti, 2011) 이용하거나 단일 파장으로서 malvidin 3-O-glucoside의 최대 흡수 파장대인 540 nm (Guillotin et al., 2009)로 측정하지만 본 실험에서는 식품첨가물공전에서의 파장 폭인 500-540 nm의 흡수파장 대에서의 흡광도로 분석하였다. HCl의 경우에는 본 실험의 흥미영역 구간 실험점에서의 수율은 HCl 1%, ethanol 60%의 조건에서 63.47%로 가장 높았으며 색가는 HCl 1%, ethanol 75%의

Table 2. Full factorial design for anthocyanin purification and its dependent variables.

Coded levels of variable		Responses					
		HCl			TFA		
X_1	X_2	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total anthocyanin contents (mg/kg)	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total anthocyanin contents (mg/kg)
-1	-1	63.40	0.27±0.00	4.30±0.32	63.24	0.30±0.00	4.82±0.27
-1	0	57.64	0.56±0.00	16.79±0.18	57.50	0.57±0.00	12.31±0.69
-1	1	54.50	0.59±0.00	11.84±0.32	54.24	0.44±0.00	9.77±0.81
0	-1	63.36	0.61±0.00	11.49±0.05	62.91	0.76±0.00	15.44±0.29
0	0	57.83	0.82±0.00	18.43±0.37	57.15	0.58±0.00	11.92±0.66
0	1	54.87	0.71±0.00	19.34±0.69	54.43	0.59±0.00	13.55±0.68
1	-1	63.47	0.57±0.00	11.84±0.90	63.39	0.70±0.01	14.19±0.19
1	0	57.68	1.00±0.00	19.69±0.63	57.73	0.81±0.00	16.86±0.40
1	1	55.03	0.71±0.01	18.39±0.60	54.59	0.59±0.00	12.76±1.01

X_1: Concentration of HCl or TFA, X_2: Concentration of ethanol.

Table 3. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, color value and total anthocyanin contents of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts.

	Factors	HCl		TFA	
		X_1	X_2	X_1	X_2
Yield	F value	2.96	2615.38	2.86	1299.72
	Prob>F	0.1986	<.0001	0.2055	<.0001
Color value	F value	23.79	26.18	11.31	2.92
	Prob>F	<.0001	<.0001	0.0008	0.0774
Total anthocyanin contents	F value	18.66	40.57	9.55	2.50
	Prob>F	<.0001	<.0001	0.0017	0.1088

X_1: Concentration of HCl or TFA, X_2: Concentration of ethanol

조건에서 0.996으로 가장 높은 값을 보였다. 총 안토시아닌 함량은 HCl 1%, ethanol 75%의 조건에서 19.69 mg/kg으로 가장 높았다. 반면에 TFA의 경우에는 수율은 TFA 1%, ethanol 60%에서 63.39%이었으며 색가는 TFA 1%, ethanol 75%에서 0.813, 총 안토시아닌 함량은 TFA 1%, ethanol 75%에서 16.86 mg/kg으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 정제된 안토시아닌의 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량을 분석한 결과 pH 조절제로서 HCl이 TFA보다 우수하게 나타났으며 용출제로서의 ethanol의 농도로는 60-75% 수준이 가장 좋은 결과를 얻었다.

이차다항회귀곡선식

흥미구역 안에서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 안토시아닌의 수율, 색가 및 안토시아닌 함량에 미치는 정도를 분산 분석한 결과 Table 3과 같다. pH 조절제로서 HCl을 사용한 경우 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량에 미치는 영향은 ethanol의 농도 변화가 HCl의 농도 변화보다 큰 것으로 나타났다. Ethanol의 농도는 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량에서 모두 0.1% 이내에서 유의성 차이를 보였다. pH 조절제로서 TFA를 사용한 경우는 수율에서만 ethanol의 농도 변화가 TFA의 농도 변화보다 큰 것으로 나타나 0.1% 이내에서 유의성 차이를 보인 반면 색가와 총 안토시아닌 함량에서는 ethanol의 농도 변화보다 TFA의 농도 변화에 영향이 큰 것으로 나타났다. 안토시아닌 색소의 정제공정에서의 pH 조건에 따른 가공 및 저장 안정성과 선명한 적색을 나타내는 안토시아닌 색소의 특성에 기인하여 HCl이나 유기산을 첨가하며 안토시아닌 색소는 일반적으로 pH가 낮을수록 추출 효율 또한 우수하다고 알려져 있다(Fuleki & Francis, 1968; Jackman et al., 1987). 처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과 Table 4와 같다. 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량에 대하여 이차다항회귀곡선식에의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정한 결과(Table 5) pH 조절제로서 HCl 또는 TFA에 관계없이 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량 기여도는 모두 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났으며 이차다항회귀곡선식 적

Table 4. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, color value and total anthocyanin contents of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts.

Parameters	Estimate					
	HCl			TFA		
	Yield	Color value	Total anthocyanin contents	Yield	Color value	Total anthocyanin contents
Intercept	114.467263	-5.714338	20.163333	113.252593	-2.079614	14.616667
X_1	-0.678601	1.352870	2.695000	-1.833333	1.372284	2.840000
X_2	-1.221926	0.157112	3.556667	-1.789407	0.063359	0.001667
$X_1 * X_1$	-0.3292018	-0.474074	-2.815000	1.407407	-0.0353086	-2.000000
$X_1 * X_2$	0.017037	-0.006981	-0.512500	0.007407	-0.009148	-1.645000
$X_2 * X_2$	0.006170	-0.00981	-5.220000	0.005956	-0.000399	-1.845000

X_1: Concentration of HCl or TFA, X_2: Concentration of ethanol

Table 5. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, color value and total anthocyanin contents of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts.

	Regressions	HCl				TFA			
		Linear	Quadratic	Cross product	Total regress	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
Yield	R^2	0.9656	0.0335	0.0005	0.9996	0.9676	0.0315	0.0001	0.9992
	Prob>F	<0.0001	0.0012	0.1538	<.0001	<.0001	0.0037	0.6067	<.0001
Color value	R^2	0.5226	0.3689	0.0283	0.9238	0.5554	0.1320	0.0765	0.7638
	Prob>F	<.0001	<.0001	0.0565	<.0001	0.0007	0.0697	0.0722	0.0018
Total anthocyanin contents	R^2	0.5862	0.3451	0.0052	0.9364	0.4736	0.1449	0.1059	0.7244
	Prob>F	<.0001	<.0001	0.3435	<.0001	0.0025	0.0793	0.0529	0.0043

합성 검정에서의 total regression은 모두 1% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

정제공정 최적화

HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 안토시아닌의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과 Fig. 2와 같다. 복분자 주를 생산하고 남는 찌꺼기를 이용하여 안토시아닌을 얻고자 열수추출 하였을 때 안토시아닌(1.36 g/100 g)보다 높은 함량의 uronic acid(41.88 g/100 g)를 비롯하여 glucose, glycerol, succinic acid, citric acid 등이 함께 추출되었으며(Ku & Mun, 2008) 열수를 포함한 용매 추출한 안토시아닌의 경우 순도를 높이기 위하여서는 정제공정이 필요하다. 안토시아닌 정제공정에서 HCl 또는 TFA의 농도보다는 ethanol의 농도에 영향을 크게 받는 것을 알 수 있었으며 ethanol의 농도가 높아짐에 따라서 수율 또한 증가하는 것으로 나타났다. pH 조절제로서 HCl의 농도 변화와 용출제로 ethanol 농도 변화에 따른 정제된 안토시아닌의 수율을 반응 표면 분석한 결과 HCl 0.41%, ethanol 60% 일 때가 최적 조건으로 63.45%로 예측되었다. 반면 TFA의 경우에서는 TFA 1.00%, ethanol 60% 일 때 63.34%로 예측되었다. 정제된 안토시아닌의 색가에 미치는 영향을 분석한 결과 Fig. 3과 같으며 HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(Fig. 3-A)에서는 두 요인이 색가에 유사하게 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며 TFA와 ethanol의 농도에 따른 변화(Fig. 3-B)에서는 TFA의 농도 변화에 대한 영향력이 더 큰 것으로 나타났다. HCl과 ethanol 농도 변화에 따른 정제된 안토시아닌의 색가의 최적 조건은 HCl 0.84%, ethanol 77.58% 일 때 0.91로 예측되었으며 TFA의 경우는 TFA 1.0%, ethanol 68.16% 일 때 0.78로 예측되었다. 정제된 안토시아닌의 총 안토시아닌 함량에 미치는 영향을 분석한 결과 Fig. 4와 같으며 HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(Fig. 4-A)에서는 ethanol의 농도가 영향력이 컸으며 TFA와 ethanol의 농도의 변화(Fig. 4-B)에서는 TFA의 농도가 영향력이 더 큰 것으로 나타났다. 최적 조건으로 HCl 0.44%, ethanol 73.81% 일 때 정제된 안토시아닌의 총 안토시아닌 함량은 19.69 mg/kg로 예측되었다. 반면 TFA의 경우는 TFA 1.0%, ethanol 70.06% 일 때 16.12 mg/kg로 예측되었다. HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 안토시아닌의 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 pH 조절제가 HCl인 경우(Fig. 5-A) 최적 정제 조건은 HCl 0.84%, ethanol 73.12%의 조건이었으며 전반적인 만족도(overall desirability)는 0.77이었다. TFA에서의(Fig. 5-B) 최적 정제 조건은 TFA 1.00%, ethanol 60.75%의 조건이었으며 전반적인 만족도는 0.96이었다.

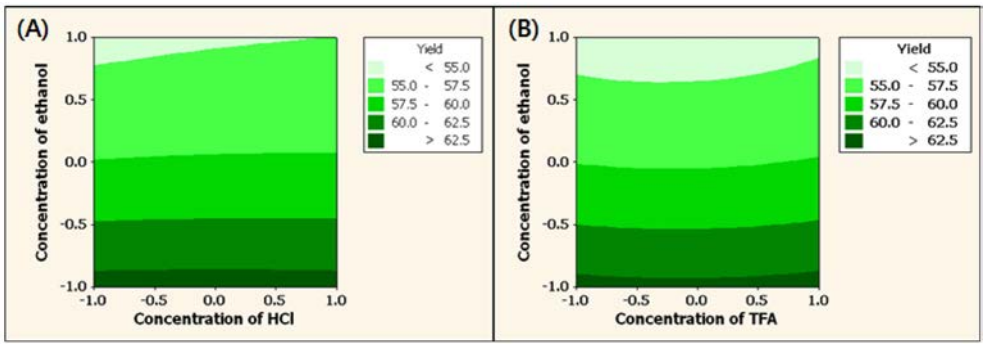

Fig. 2. Contour plot for yield of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts. A: HCl, B: TFA.

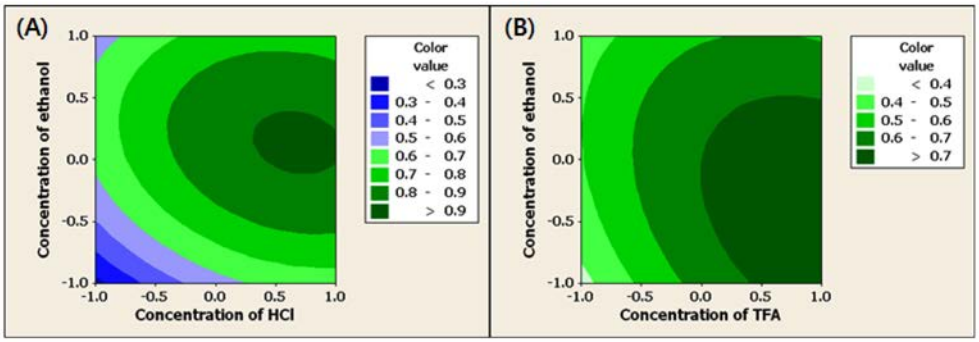

Fig. 3. Contour plot for color value of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts. A: HCl, B: TFA.

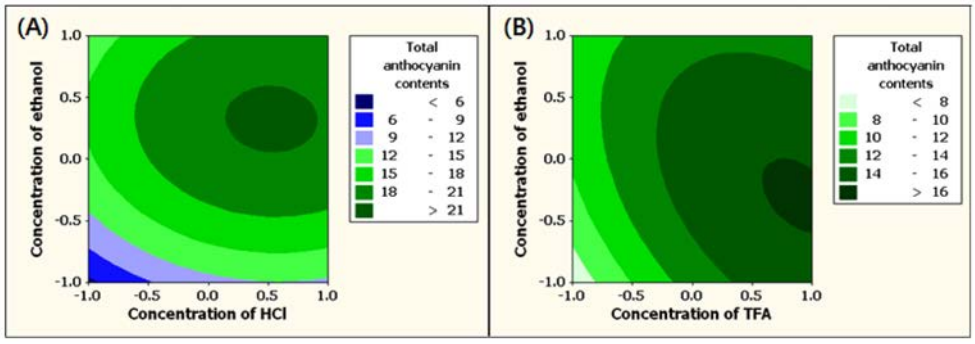

Fig. 4. Contour plot for total anthocyanin content of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts. A: HCl, B: TFA.

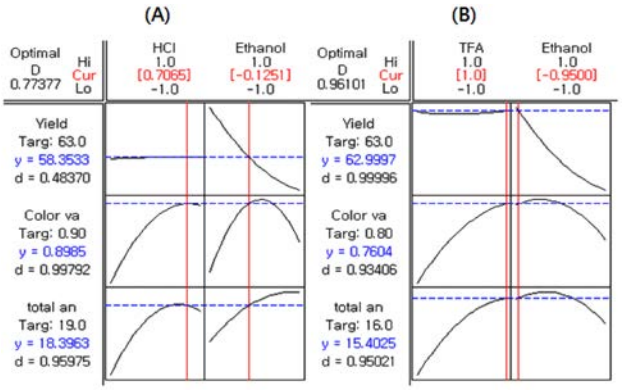

Fig. 5. Response optimization for multi-response surface of purified anthocyanin from *Bokbunja* byproducts. A: HCl, B: TFA.

요 약

본 연구는 복분자박의 안토시아닌을 천연색소원으로 활용하기 위하여 MCX SPE cartridge를 흡착제로 사용하였으며 pH 조절제로서 HCl 또는 trifluoroacetic acid(TFA)의 농도 변화 및 용출제로서 ethanol 농도 변화에 따른 수율, 색 가 및 총 안토시아닌 함량 등을 반응표면분석법에 의하여 최적화하였다. 정제된 안토시아닌의 수율, 색가 및 총 안토시아닌 함량을 전반적으로 분석한 결과 pH 조절제로서 HCl이 TCA보다 우수하게 나타났으며 용출제로서의 ethanol의 농도로는 60-75%수준에서 가장 좋은 결과를 얻었다. 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 분석한 결과 pH 조절제가 HCl인 경우 최적 분리정제 조건은 HCl 0.84%, ethanol 73.12%의 조건이었으며 전반적인 만족도는 0.77이었다. TFA에서의 최적 분리정제조건은 TFA 1.0%, ethanol 60.75%의 조건이었으며 전반적인 만족도는 0.96이었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 111136-03-2-HD110)의 지원에 의한 연구결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

Castaneda-Ovando A, Pacheco-Hernandez ML, Paez-Hernandez ME, Rodriguez JA, Galan-Vidal CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins. Food Chem. 113: 859-871.

Choi SJ. 2010. The difference of anthocyanin pigment composition and color expression in fruit skin of several grape cultivars. Korean J. Food Preserv. 17: 847-852.

Choung MG. 2004. Analysis of anthocyanins. Korean J. Crop Sci. 49: 55-67.

Choung MG, Lim JD. 2012. Antioxidant, anticancer and immune avtivation of anthocyanin fraction from *Rubus coreanus* Miquel fruits (*Bokbunja*). Korean J. Medicinal Crop Sci. 20: 259-269.

Cooper-Diver GA. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. Phytochemistry 56: 229-236.

Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. 2006. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. European J. Nutr. 45: 7-18.

Fuleki T, Francis FJ. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. J. Food Sci. 33: 72-77.

Guillotin S, Sanoner P, Renard CMGC. 2009. Stabilization of the colour of anthocyanin in solutions by admixture with phytocomponents from apple. J. Hortic. Sci. Biotech. ISAFRUIT Special Issue 96-99.

He J, Giusti MM. 2011. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables-A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. J. Chromatogr. A. 1218: 7914-7922.

Hosseinian FS, Li W, Beta T. 2008. Measurement of anthocyanins other phytochemicals in purple wheat. Food Chem. 109: 916-924.

Jackman RL, Yada RY, Tung MA. 1987. Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. A review. J. Food Biochem. 11: 279-308.

Jeong YJ, Seo JH. 2009. Conditions for pigment extraction from *Bokbunja (Rubus coreanus* Miquel) byproducts. Korean J. Food Preserv. 16: 400-404.

Konczak I, Zhang W. 2004. Anthocyanins-more than nature colors. J. Biomed. Biotechnol. 2004: 239-240.

Ku CS, Mun SP. 2008. Optimization of extraction of anthocyanin from *Bokbunja (Rubus coreanus* Miq.) marc produced traditional wine processing and characterization of the extracts. Bioresource Technol. 99: 8325-8330.

Metivier RP, Francis FJ, Clydesdale FM. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. J. Food Sci. 45: 1099-1100.

Ryu IH, Kwon TO. 2013. Optimization of macerating enzymatic extraction process and components change of extract of *Rubus coreanus* Miq. fruit. Korean J. Medicinal Crop Sci. 21: 97-104.